VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Ref.: 354-8101

Instructions

Test to detect and quantify *Brettanomyces bruxellensis* using real-time PCR

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

1 - INTRODUCTION

2 - PRINCIPLE BEHIND THE VINEO™ *Brettanomyces* test PCR Kit

3 - KIT COMPOSITION

4 - VALIDITY AND PRESERVATION

5 - REQUIRED EQUIPMENT THAT IS NOT PROVIDED

6 - PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS

7 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES

8 - DNA EXTRACTION

9 - REAL-TIME PCR

10 - ANALYSIS OF THE DATA

11 - INTERPRETATION OF THE RESULTS

12 - CONFIRMATION PROTOCOL FROM ISOLATED COLONIES

13 - TEST PERFORMANCE AND VALIDATIONS

APPENDIX A - PCR AMPLIFICATION REAGENT MIXTURE PREPARATION TABLE

APPENDIX B - PLATE SETUP FOR THE Chromo4™ OR THE CFX96™ THERMOCYCLERS

APPENDIX C - PLATE SETUP FOR THE MiniOpticon™ THERMOCYCLER

 © 2010 Bio-Rad

1 - INTRODUCTION

Brettanomyces bruxellensis is a type of yeast that is responsible for the presence of 4-ethyl Phenol and 4-ethylguaiacol in wine-type drinks, fruit juices and beers that involves significant economic losses. In wines, its presence is difficult to detect using classic culture methods, which take a long time and are non-specific.

Rapid, specific and early detection of this yeast in the wine production would, however, allow the oenologist and the producer to take preventive measurements and to eliminate it before the appearance of the phenolated character that is characteristic of changes induced by this yeast. Compared with the traditional microbiological method, molecular biology provides high speed, high sensitivity and high specificity detection solutions.

Diagnosis of the presence of this yeast must make it possible to determine at what risk level the wine is and how this risk develops over time. This risk is variable according to the contamination level of the wine. Therefore, an adapted quantification tool is used to determine whether (i) the population is low and therefore that risk is low or even controlled, (ii) regular monitoring is required and the wine can be processed, in intermediate or critical quantities in the event that the wine must be supervised (iii) and finally whether the population is very high and in the event that the risk of producing volatile phenols is also high, an immediate and urgent action is required for the wine.

In all cases, regular monitoring is recommended. It is important to monitor the development *Brettanomyces bruxellensis* of in the wine.

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit is a quantitative test used for specific detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wines and grape musts in fermentation using the real-time polymerase chain technique (RT-PCR). A specific sequence of *Brettanomyces bruxellensis* is amplified and detected simultaneously by means of a fluorescent probe. Implementation of this test is used to obtain a quantitative result less than 3 hours after extracting the DNA (VINEO™ Extract DNA Kit, 354-8100). The analysis software adapted to these tests, Opticon Monitor™ or CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition, make it possible to measure the *Brettanomyces bruxellensis* risk in the analysed wine sample by an automatic and quantitative analysis. An interpretation of the risk level is proposed to the user in this way. It is linked to the number of CFU.ml-1 (Colony-forming unit) detected in the wine:

- Negative
- Low population, controlled risk
- Critical population to be monitored
- Very high population, risk of production of volatile Phenols

The VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit can also be used in a qualitative mode to confirm isolated colonies from a culture medium.

2 - PRINCIPLE BEHIND THE VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit

This test is based on amplification, detection and quantification of DNA sequences using the real-time PCR technique. It uses primers and a DNA probe that are specific to *Brettanomyces bruxellensis*. Detection and analysis of the results are optimised for use with a thermocycler for Bio-Rad real-time PCR such as MiniOpticon™, Chromo4™ or CFX96™.

During the PCR reaction, the primers will be hybridised in the target region and will then - catalysed by the polymerase - lengthen in the 5'-3' direction using the desoxynucleotide triphosphate (dNTPs) present in the reagent mixture, thereby creating a complementary DNA sequence, called an amplicon.

During PCR, oligonucleotidic probes that are specific to the target sequence will be hybridised with the amplicons. These probes, which are marked by fluorophores, only emit fluorescence when hybridisation takes place. The probe that is linked to the target sequence of *Brettanomyces bruxellensis* is marked by a specific fluorophore. Intensity of fluorescence increases proportionally to the increase in quantity of amplification products in the PCR tube. The fluorescence that is generated in this way is directly measured by the optical module of the thermocycler.

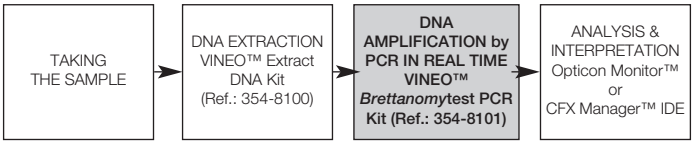
A synthetic DNA called the "Internal control" is added to each reaction. It is amplified at the same time as the target sequences of *Brettanomyces bruxellensis* but detected by a probe marked with a second fluorophore. It is used to bring out any reaction inhibiting phenomenon.

The software associated with the device calculates the relation between the intensity of the fluorescence and the amplification cycle automatically. This relation shows the presence or absence of *Brettanomyces bruxellensis* in the sample.

The results obtained by amplification of this DNA are analysed by the Opticon Monitor™ or CFX Manager™ IDE software that have been programmed to carry out an automatic and quantitative analysis. An interpretation of the risk linked to the presence of *Brettanomyces bruxellensis* is then proposed to the user.

 © 2010 Bio-Rad

This test is used to detect and quantify *Brettanomyces bruxellensis* in the DNA extracted from fermented drinks produced from grape and fermenting grape musts.



3 - KIT CONTENTS

Stoppers	Designation	Reagent	Volume
Pink	Fluorescent probes	Fluorescent probes	1 tube (0.55 mL)
White	Amplification mix	Amplification mix	2 tubes (2 x 2.2 mL)
Green	Negative PCR control	Negative PCR control	1 tube (0.5 mL)
Red	Positive Qs PCR control	Positive Qs PCR control	1 tube (0.5 mL)

This kit contains the quantity of reagent required for 96 reactions.

4 - VALIDITY AND PRESERVATION

On reception, the kit must be stored at temperatures between +2°C and +8°C. Each reagent stored between +2°C and +8°C can be used until the expiry date indicated on the tube.

NB: *Do not freeze the reagents.*

5 - REQUIRED EQUIPMENT THAT IS NOT PROVIDED

Equipment:

- Industrial Diagnostic CFX96™ real-time PCR detection system, 96 wells, ref. Bio-Rad :359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, ref. Bio-Rad : 359-3893
- MiniOpticon™ system for real-time PCR, reaction block of 48 wells, ref. Bio-Rad: 359-3995
- Vortex
- Optionally: centrifuge with rotor for plates or strips (max. 2000 x G)
- 20 µl, 200 µl and 1000 µl micropipettes
- Multi-distributor such as combitip pipettes

Note: We recommend using an uninterruptible power supply with the thermocycler.

Consumables:

- For the plates, PCR tubes and stop caps:
  - White plates of 96 "Low-profile" wells, ref. Bio-Rad: MLL-9651
- White plates of 48 "Low-profile" wells, ref. Bio-Rad: MLL-4851
- Strips of 8 tubes of 200µl "Low-profile", ref. Bio-Rad: TLS-0851
- Strips of 8 flat optical stop caps for tubes or plates of 0.2 mL wells, 120 strips ref. Bio-Rad: TCS-0803
- Cones for Combitip or multi-distributor, sterile when packaged individually
- Cones with sterile filters that are adaptable to 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL and 1000 µL micro-pipettes
- 2mL and 5mL sterile tubes
- Non-powdered latex or nitrile gloves
- Sterile distilled water
- 5% Chlorine Bleach
- Decontaminating agent such as DNA AWAY® or RNAse AWAY®

6 - PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS

- This trial must be carried out by staff who have had adequate training.
- Result quality depends on scrupulous compliance with Laboratory Good Practice, in particular in the area of PCR:
  - The equipment (pipettes, tubes etc.) must no go from one work station to another.
  - It is indispensable to use a positive and a negative control for each series of amplification reactions.
  - Do not use the reagents beyond their expiry date.
  - Subject the reagents in the kit to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose before using them to work with homogeneous solutions.
  - Check the exactness and the precision of the pipettes as well as the proper functioning of the instruments.
  - Change gloves regularly and as soon as you suspect that they may have been contaminated.
  - Clean work surfaces regularly with a 5% solution of chlorine bleach and another agent such as DNA AWAY® or RNase AWAY®.
  - Wear non-powdered gloves so as not to leave fingerprints on the optical film used to seal the micro-plates. Do not write on the PCR tube stoppers. In both cases, recording the data by the device can be disturbed.

© 2010 Bio-Rad

We strongly recommend that you read the complete protocol before beginning the trial.
Follow the suggested protocol scrupulously.

7 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES

Wine samples are collected under aseptic conditions in sterile glass or polyethylene recipients or recipients made out of similar material.
The samples must be submitted to the laboratory as quickly as possible, preferably within 24 and not more than 48 after taking the sample. If the samples are transported and analysed within 24 h, transport and storage take place at ambient temperature (+18°C to +30°C). If the samples are transported and analysed within 48 h, transport and storage take place at between +2°C to +8°C.

8 - DNA EXTRACTION

DNA extraction must be carried out using the kit developed by Bio-Rad to extract DNA from wine sample: VINEO™ Extract DNA Kit (ref. Bio-Rad 354-8100).

9 - REAL-TIME PCR

1. Starting up the PCR apparatus

Switch the thermocyler and the computer on in that order and start up the Opticon Monitor software. For more information and for the definition of software parameters, see the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

2. Preparing PCR reactions

2.1 Prepare the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit reagent mixture by mixing (40 µL/sample) the **amplification solution** (tube with white stopper) and (5 µL/sample) the **fluorescent probes** (tube with pink stopper). Carry out the reagent mixture on the basis of the number of samples and controls to be analysed (at least 1 duplicate (2) of the positive Qs PCR control and a negative control must be used per plate). The PCR amplification reagent mixture preparation table in **Appendix A** indicates the required quantities of each reagent to be mixed on the basis of the number of samples to be analysed. Do not forget to include the 2 control points.
Note: do not mix reagent batches.

© 2010 Bio-Rad

2.2 After preparation, the reagent mix (amplification and probe solutions) must be used immediately, or can be stored for **2 hours between +2°C and +8°C**.

2.3 Distribute **45 µl** of this reagent mixture per well according to the defined plate surface. **Appendices B and C** propose plate surfaces to be used for the Chromo4™/CFX96™ and MiniOpticon™ thermocyclers respectively.

Add **5 µl** of sample or negative control or Qs PCR positive control and seal the wells on the plate or the strips hermetically. It is important to insist on sealing the wells and the strips to avoid any evaporation phenomenon during the PCR reaction.
It is important to avoid the presence of bubbles at the bottom of the wells by pipetting cautiously. To eliminate bubbles after sealing the plate or closing the PCR strips, you may centrifuge the plate of PCR strips briefly. The plate can be store at **+2°C to +8°C for 2 hours**.

2.4 Put the plate or the PCR strips into the thermocycler. Make sure that they are correctly oriented (well A1 at the top left).
Close the reaction module.

3. Starting the amplification reaction
To restart the PCR, refer to the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

10 - ANALYSIS OF THE DATA
Data analysis can be carried out directly at the end of the amplification reaction or later by re-opening the data file. To open the data files and analyse the results of the PCR, refer to the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

11 - INTERPRETATION OF THE RESULTS
To obtain the analysis results, you only have to read the values of Ct (Cycle threshold): value of the amplification cycle from which fluorescence increases significantly above background noise.

Manual analysis will only be used for a qualitative analysis (presence or absence).

 © 2010 Bio-Rad

You must use the the Opticon Monitor™ software (version 3.3 and higher) or the CFX Manager™ software Industrial Diagnostic Edition for an automated and quantitative interpretation. A complete report may be printed (cf. software instructions).

1. Controls

Before a final interpretation of the results, you have to check the results of the negative and positive controls.

For the test to be valid, the results of the negative and positive controls must be as follows:

	Detection of *Brettanomyces bruxellensis* (FAM)	**Detection of the internal control (Channel HEX)**
Negative control	Ct = N/A*	25 ≤ Ct ≤ 40
Positive Qs PCR control	27 ≤ Ct ≤ 37	Not significant

** N/A means "Not Applicable". The software indicates N/A for the Ct of a sample when the fluorescence curve does not cross the threshold.*

If the results of the positive and negative PCR Qs controls are different from those described in the table below, you have to begin the PCR again.

2. Samples

A sample is considered to be **positive** for *Brettanomyces bruxellensis* if the value of Ct ≥ 10 is obtained for the FAM fluorophore.

If no value is obtained for Ct_{FAM} (Ct_{FAM} = N/A), the interpretation of the result depends on the value of the internal control:

- A sample is considered to be **negative** for *Brettanomyces bruxellensis* if no value of Ct is obtained for the FAM fluorophore (Ct_{FAM} = N/A and if the Ct of the internal control is greater than or equal to 28. ($Ct_{HEX} \geq 28$).
- An N/A value for the Ct_{HEX} of the internal control indicates that an inhibition phenomenon of the PCR reaction has probably occurred, if the Ct_{FAM} of the target is also N/A. In this case, the DNA sample must be diluted (to $1/10^{th}$ for example) in sterile distilled water and then subjected to a new PCR.
- If the Ct_{HEX} of the internal control is less than 28, it is impossible to interpret the result. Check that the threshold was set correctly or that the raw curve shows an aspect characteristic of exponential amplification. If the observed curve is not correct, it will be necessary to repeat the PCR test for this sample.

Interpretation of results obtained for the samples:

Detection of Brettanomyces bruxellensis (FAM)	Detection of the internal control	Interpretation
Ct ≥ 10***	Not significant	Positive
Ct = N/A	Ct_{HEX} ≥ 28	Negative
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibition**

***: In the event of a null value for a sample and its internal control (Ct = N/A), the analysis must be done again with the diluted DNA sample (diluted to 1/5th or to 1/10th for example).*
****: A value less than 10 may be obtained; check whether the curve as raw data shows an aspect that is characteristic of exponential amplification (flat base line and regular increase in fluorescence followed by a plateau). If the observed curve is correct, the sample for the presence of Brettanomyces bruxellensis may be considered to be positive. Otherwise, the interpretation of the result depends on the value of the internal control, as is explained in the previous paragraphs.*

12 - CONFIRMATION PROTOCOL FROM ISOLATED COLONIES

You can use the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit to confirm isolated colonies on agarose gel.

1. Puncture an isolated colony, whether it comes from a selective medium or not, using a toothpick or a 1 µl piercing instrument, or any other consumable adapted to this purpose (a pipette cone for example).

2. Resuspend the colony in 100 µl of R2 in an Eppendorf tube (it is possible to resuspend the colony in steril physiological water, PCR efficiency can then be affected). Homogenise the suspension by means of a vortex.

3. Put 5 µl of suspension in 45 µl of PCR reagent mixture (cf. part 9.2 Real-time PCR) and follow the rest of the VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit method to obtain and interpret results. ***Note: only a qualitative analysis is made from the PCR carried out on this suspension. The signal obtained by PCR is often quite high because the quantity of cells sampled and analysed by PCR using this method is quite significant.***

13 - TEST PERFORMANCE AND VALIDATIONS

The VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit is specific for detecting *Brettanomyces bruxellensis*. You can detect the yeast from:

- 500 CFU/mL of wine using the DNA extraction protocol described in the VINEO™ Extract DNA Kit: for 1.8 mL for fermenting grape must or a heavy wine during the wine-making or maturing process and
- 10 CFU/mL of wine according to the protocol starting from 45 mL for slightly heavy wine, close to bottling or already bottled, the analysis of which requires a high level of analytic sensitivity.

 © 2010 Bio-Rad

APPENDIX A - PCR AMPLIFICATION REAGENT MIXTURE PREPARATION TABLE

Use this table to determine the required quantities of fluorescent probes and amplification solution to prepare the PCR reagent mixture. **Calculation of the number of samples must include the 2 positive Qs PCR controls and the negative control**.

Number of samples	Fluorescent probes (µL) (Pink stopper)	Amplification solution (µL) (White stopper)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1037
25	135	1080
26	140	1123
27	146	1166
28	151	1210
29	157	1253
30	162	1296
31	167	1339
32	173	1382
33	178	1426
34	184	1469
35	189	1512
36	194	1555
37	200	1598
38	205	1642
39	211	1685
40	216	1728
41	221	1771
42	227	1814
43	232	1858
44	238	1901
45	243	1944
46	248	1987
47	254	2030
48	259	2074

Number of samples	Fluorescent probes (µL) (Pink stopper)	Amplification solution (µL) (White stopper)
49	265	2117
50	270	2160
51	275	2203
52	281	2246
53	286	2290
54	292	2333
55	297	2376
56	302	2419
57	308	2462
58	313	2506
59	319	2549
60	324	2592
61	329	2635
62	335	2678
63	340	2722
64	346	2765
65	351	2808
66	356	2851
67	362	2894
68	367	2938
69	373	2981
70	378	3024
71	383	3067
72	389	3110
73	394	3154
74	400	3197
75	405	3240
76	410	3283
77	416	3326
78	421	3370
79	427	3413
80	432	3456
81	437	3499
82	443	3542
83	448	3586
84	454	3629
85	459	3672
86	464	3715
87	470	3758
88	475	3802
89	481	3845
90	486	3888
91	491	3931
92	497	3974
93	502	4018
94	508	4061
95	513	4104
96	518	4147

© 2010 Bio-Rad

APPENDIX B
PLATE SETUP FOR THE Chromo4™/CFX96™ THERMOCYCLERS

The first 3 wells in column 1 may be used to analyse the 3 control points. The other wells in the plate will be used for the samples to be analysed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QS											
B	QS											
C	NC											
D	Sample											
E	Sample											
F	…											
G												
H												

NC: Negative PCR control
QS: Positive Qs PCR control

APPENDIX C
PLATE SETUP FOR THE MiniOpticon™ THERMOCYCLER

The first 3 wells in column 1 may be used to analyse the 3 control points. The other wells in the plate will be used for the samples to be analysed.

	1	2	3	4	5	6
A	QS					
B	QS					
C	NC					
D	Sample					
E	Sample					
F	…					
G						
H						

NC: Negative PCR control
QS: Positive Qs PCR control

 © 2010 Bio-Rad

NOTICE OF CONCERN TO THE PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and the corresponding patent claims outside the United States: 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (claims 1 to 23 only) and 5 773 258 (claims 1 and 6 only) and by the claims outside the United States that correspond to US patent n° 4 889 818. The purchase of this product includes limited immunity from legal proceedings that may not be transferred according to the claims of previous patents when this quantity of product is solely used for alimentary analysis, environmental and industrial microbiology purposes including publication of the results of the purchaser's activities in return for payment or other commercial counterpart, and when it is also used for the purchaser's own research purposes. No right according to any patent claim (such as the claims of method 5'-nuclease in US patents n° 5 210 015 and 5 487 972) is not expressly transferred whether by implication or preclusion. Further information on the purchase of licenses may be obtained by contacting the Director of Licenses, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, United States.

 © 2010 Bio-Rad

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Réf. : 354-8101

Notice d'utilisation

Test pour la détection et quantification par PCR en temps réel de *Brettanomyces bruxellensis*

© 2010 Bio-Rad

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION

2 - PRINCIPE DU VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit

3 - COMPOSITION DU KIT

4 - VALIDITE ET CONSERVATION

5 - EQUIPEMENT ET MATERIEL NECESSAIRES NON FOURNIS

6 - PRECAUTIONS ET RECOMMANDATIONS

7 - PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

8 - EXTRACTION DE L'ADN

9 - PCR EN TEMPS REEL

10 - ANALYSE DES DONNEES

11 - INTERPRETATION DES RESULTATS

12 - PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLEES

13 - PERFORMANCES DU TEST ET VALIDATIONS

ANNEXE A - TABLEAU DE PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL D'AMPLIFICATION PCR

ANNEXE B - PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LES THERMOCYCLEURS Chromo4™ OU CFX96™

ANNEXE C - PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE THERMOCYCLEUR MiniOpticon™

 © 2010 Bio-Rad

1 - INTRODUCTION

Brettanomyces bruxellensis est une levure responsable de la présence des 4-ethyl Phénol et 4-ethyl Guaiacol dans les boissons de type vins, jus de fruits et bières impliquant des pertes économiques importantes. Dans les vins, sa présence est difficile à détecter par les méthodes de culture classiques qui sont longues et non spécifiques.

La détection rapide, spécifique et précoce de cette levure dans le processus d'élaboration des vins permettrait cependant à l'œnologue et au producteur de prendre des mesures de prévention et de l'éliminer avant l'apparition du caractère phénolé, caractéristique de l'altération par cette levure. Face à la méthode microbiologique traditionnelle, la biologie moléculaire apporte des solutions de détection à de hauts niveaux de rapidité, de sensibilité et de spécificité.

Le diagnostic de la présence de cette levure doit permettre de déterminer à quel niveau de risque se trouve le vin et comment évolue ce risque dans le temps. Ce risque est variable selon le niveau de contamination du vin. Ainsi un outil de quantification adapté permet de déterminer si (i) la population est en faible quantité et donc que le risque est faible voire maîtrisé, (ii) en quantité intermédiaire ou critique, dans ce cas le vin doit être surveillé, un suivi régulier s'impose, le vin peut être traité (iii) et enfin si la population est très importante, et dans ce cas le risque de production des phénols volatils l'est aussi, une action immédiate et urgente s'impose sur le vin.

Dans tous les cas un suivi régulier est préconisé. Il est important de suivre l'évolution des *Brettanomyces bruxellensis* au sein du vin.

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit est un test quantitatif permettant la détection spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins et les moûts en fermentation par la technique de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR). Une séquence d'ADN spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* est amplifiée et détectée simultanément grâce à une sonde fluorescente. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention d'un résultat quantitatif moins de 3h après l'extraction d'ADN (VINEO™ Extract DNA Kit, 354-8100). Les logiciels d'analyse adaptés à ce test, Opticon Monitor™ ou CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition, permettent par une analyse automatique et quantitative, de mesurer le risque *Brettanomyces bruxellensis* dans l'échantillon de vin analysé. Une interprétation du niveau de risque est ainsi proposée à l'utilisateur. Elle est liée au nombre d'UFC.mL-1 (Unité Formant Colonie) détecté dans le vin :

- Négatif
- Population faible, risque maîtrisé
- Population critique à surveiller
- Population très élevée, risque de production de Phénols volatils

Le VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit peut également être utilisé sur un mode qualitatif pour la confirmation de colonies isolées à partir d'un milieu de culture.

2 - PRINCIPE DU VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Ce test repose sur l'amplification, la détection et la quantification de séquences d'ADN par la technique de PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Brettanomyces bruxellensis*. La détection et l'analyse des résultats sont optimisées pour l'utilisation avec un thermocycleur pour la PCR en temps réel Bio-Rad, tel que le MiniOpticon™, le Chromo4™ ou le CFX96™.

Au cours de la réaction de PCR, les amorces vont s'hybrider à la région cible puis, catalysées par la polymérase, s'allonger dans le sens 5'-3' en utilisant les désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) présents dans le mélange réactionnel, créant ainsi une séquence complémentaire d'ADN, appelée amplicon.

Pendant la PCR, des sondes oligonucléotidiques, spécifiques de la séquence cible, vont s'hybrider aux amplicons. Ces sondes, marquées par des fluorophores, émettent de la fluorescence uniquement quand l'hybridation a lieu. La sonde qui se lie à la séquence cible de *Brettanomyces bruxellensis* est marquée par un fluorophore spécifique. L'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à l'augmentation de la quantité des produits d'amplification dans le tube de PCR. La fluorescence ainsi générée est mesurée directement par le module optique du thermocycleur.

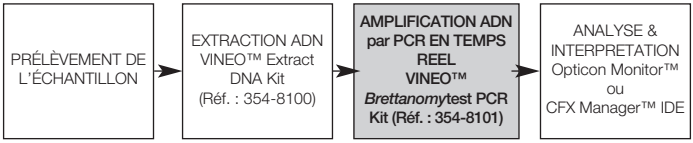
Un ADN synthétique appelé « Contrôle interne » est ajouté à chaque réaction. Il est amplifié en même temps que les séquences cibles de *Brettanomyces bruxellensis*, mais détecté par une sonde marquée avec un deuxième fluorophore. Il permet de mettre en évidence un éventuel phénomène d'inhibition de la réaction.

Le logiciel associé à l'appareil calcule automatiquement la relation entre l'intensité de la fluorescence et le cycle d'amplification. Cette relation indique la présence, ou l'absence, de *Brettanomyces bruxellensis* dans l'échantillon.

Les résultats obtenus pour l'amplification de ces ADN sont analysés par les logiciels Opticon Monitor™ ou CFX Manager™ IDE software programmés

 © 2010 Bio-Rad

pour réaliser une analyse automatique et quantitative. Une interprétation concernant le risque lié à la présence de *Brettanomyces bruxellensis* est alors proposée à l'utilisateur.
Ce test permet la détection et la quantification de *Brettanomyces bruxellensis* dans les ADN extraits à partir de boissons fermentées issues de raisin et des moûts en fermentation.


PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON
EXTRACTION ADN VINEO™ Extract DNA Kit (Réf. : 354-8100)
AMPLIFICATION ADN par PCR EN TEMPS REEL VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit (Réf. : 354-8101)
ANALYSE & INTERPRETATION Opticon Monitor™ ou CFX Manager™ IDE

3 - COMPOSITION DU KIT

Bouchons	Désignation	Réactif	Volume
Rose	Fluorescent probes	Sondes fluorescentes	1 tube (0,55 mL)
Blanc	Amplification mix	Solution d'amplification	2 tubes (2 x 2,2 mL)
Vert	Negative PCR control	Contrôle négatif PCR	1 tube (0,5 mL)
Rouge	Positive Qs PCR control	Contrôle positif Qs PCR	1 tube (0,5 mL)

Ce kit contient la quantité de réactif nécessaire pour 96 réactions.

4 - VALIDITE ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube.
NB : *Ne pas congeler les réactifs.*

5 - EQUIPEMENT ET MATERIEL NECESSAIRES NON FOURNIS

Equipements :

- Industrial Diagnostic CFX96™ pour la PCR en temps réel, bloc réactionnel de 96 puits, réf. Bio-Rad: 359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, réf. Bio-Rad : 359-3893
- Système MiniOpticon™ pour la PCR en temps réel, bloc réactionnel de 48 puits, réf. Bio-Rad: 359-3995
- Vortex
- En option: centrifugeuse avec rotor pour plaque ou barrette (max. 2000 x G)

• 20 µl, 200 µl and 1000 µl micropipettes
• Multi-distributeur, tel que combitip pipettes

Remarque : Nous recommandons l'utilisation d'un onduleur électrique avec le thermocycleur.

Consommables :

• Pour les plaques, tubes PCR et capuchons :
  - Plaques blanches de 96 puits "Low-profile", réf. Bio-Rad: MLL-9651
  - Plaques blanches de 48 puits "Low-profile", réf. Bio-Rad: MLL-4851
  - Barrettes de 8 tubes de 200 µl "Low-profile", réf. Bio-Rad: TLS-0851
  - Barrettes de 8 capuchons optiques plats, pour tubes ou plaques de puits de 0,2 mL, 120 barrettes Réf. Bio-Rad : TCS-0803
• Cônes pour Combitip ou multi-distributeur, stériles à emballage individuel
• Cônes à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl et 1000 µl
• Tubes stériles de 2 mL et de 5 mL
• Gants non-poudrés latex ou nitrile
• Eau distillée stérile
• Eau de javel 5%
• Agent décontaminant tel que DNA AWAY® ou RNAse AWAY®

6 - PRECAUTIONS ET RECOMMANDATIONS

• Cet essai doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
• La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des Bonnes Pratiques de Laboratoire, en particulier en matière de PCR :
  - Le matériel (pipettes, tubes etc...) ne doit pas circuler d'un poste de travail à l'autre.
  - Il est indispensable d'utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
  - Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
  - Vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
  - Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
  - Changer de gants régulièrement et dès que vous soupçonnez qu'ils peuvent être contaminés.
  - Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de javel 5% et autre agent tel que DNA AWAY® ou RNase AWAY®.
  - Porter des gants non-poudrés pour ne pas laisser des traces de

 © 2010 Bio-Rad

doigts sur le film optique utilisé pour sceller les microplaques. Ne pas écrire sur les bouchons des tubes PCR. Dans les deux cas, l'enregistrement des données par l'appareil peut être perturbé.

Nous vous recommandons vivement de lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai.

Respecter scrupuleusement le protocole proposé.

7 - PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Les échantillons de vins sont collectés, en conditions aseptiques, dans des récipients stériles en verre, en polyéthylène ou en matériel similaire.

Les échantillons doivent être remis au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24 heures et pas plus de 48 heures après le prélèvement. Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24 heures, le transport et le stockage ont lieu à température ambiante (+18°C à +30°C). Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48 heures, le transport et le stockage ont lieu entre +2°C et +8°C.

8 - EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction de l'ADN doit être réalisée en utilisant le kit développé par Bio-Rad pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de vin VINEO™ Extract DNA Kit (réf. Bio-Rad 354-8100).

9 - PCR EN TEMPS REEL

1. Mise en marche appareil PCR

Allumer dans l'ordre le thermocycleur, l'ordinateur puis ouvrir le logiciel Opticon Monitor. Pour plus d'informations et pour la définition des paramètres du logiciel consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ *Brettanomyc*test PCR Kit.

2. Préparation des réactions PCR

2.1 Préparer le mélange réactionnel VINEO™ *Brettanomyc*test PCR Kit en mélangeant (40 µL/échantillon) de la **solution d'amplification** (tube à bouchon blanc) et (5 µL/échantillon) des **sondes fluorescentes** (tube à bouchon rose). Réaliser le mélange réactionnel en fonction du nombre d'échantillons et des contrôles à analyser (au minimum 1 duplicat (2) du contrôle positif Qs PCR et un contrôle négatif doivent être utilisés par plaque). Le tableau de préparation du mélange réactionnel d'amplification PCR présent en **Annexe A** indique les quantités nécessaires de chaque réactif à mélanger en fonction du nombre d'échantillons à analyser. Ne pas oublier de comptabiliser les 3 points de contrôles.

Note : ne pas mélanger les lots de réactifs.

2.2 Après préparation, le mélange réactionnel (Solutions d'amplification et de sondes) doit être utilisé immédiatement, ou il peut être conservé pendant **2 heures de +2°C à +8 °C**.

2.3 Répartir **45 µl** de ce mélange réactionnel par puits, selon le plan de plaque défini. Les **Annexes B et C** proposent des plans de plaque à utiliser respectivement sur les thermocycleurs Chromo4™/CFX96™ et MiniOpticon™.

Ajouter **5 µl** d'échantillon ou de contrôle négatif ou de contrôle positif Qs PCR et sceller de façon hermétique les puits de la plaque ou des barrettes. Il est important d'insister sur la fermeture des puits et des barrettes pour éviter tout phénomène d'évaporation au cours de la réaction de PCR.
Il est important d'éviter la présence de bulles au fond des puits en pipetant précautionneusement. Pour éliminer des bulles, après avoir scellé la plaque ou avoir fermé les barrettes PCR, il est possible de centrifuger brièvement la plaque ou les barrettes PCR. La plaque peut être conservée pendant **2 heures de +2°C à +8 °C**.

2.4 Placer la plaque ou les barrettes PCR dans le thermocycleur. S'assurer de leur bonne orientation (puits A1 en haut à gauche).
Fermer le module réactionnel.

3. Lancement de la réaction d'amplification
Pour le lancement de la PCR, consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

10 - ANALYSE DES DONNEES
L'analyse des données peut être réalisée directement à la fin de la réaction d'amplification ou ultérieurement en ré-ouvrant le fichier de données. Pour ouvrir des fichiers de données et analyser les résultats de la PCR, consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

11 - INTERPRETATION DES RESULTATS
Pour obtenir les résultats de l'analyse, il suffit de lire les valeurs de Ct (Cycle treshold) : valeur du cycle d'amplification à partir duquel la fluorescence s'élève significativement au-dessus du bruit de fond.
L'analyse manuelle permettra uniquement une analyse qualitative (présence ou absence).

 © 2010 Bio-Rad

Il est nécessaire d'utiliser les logiciels Opticon Monitor™ (version 3.3 et plus) ou CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition pour une interprétation automatisée et quantitative. Un rapport complet pourra être imprimé (Cf. notice d'utilisation des logiciels).

1. Contrôles

Avant l'interprétation finale des résultats il est nécessaire de vérifier les résultats des contrôles négatif et positif.

Pour que le test soit valide, les résultats des contrôles négatif et positif doivent être les suivants :

	Détection de *Brettanomyces bruxellensis* (FAM)	**Détection du contrôle interne (Canal HEX)**
Contrôle négatif	Ct = N/A*	25 ≤ Ct ≤ 40
Contrôle positif Qs PCR	27 ≤ Ct ≤ 37	Non significatif

** N/A signifie « Non Applicable ». Le logiciel indique N/A pour le Ct d'un échantillon quand la courbe de fluorescence ne croise pas le seuil.*

Si les résultats des contrôles positif Qs PCR et négatif sont différents de ceux décrits dans le tableau ci-dessus, il est nécessaire de recommencer la PCR.

2. Echantillons

Un échantillon est considéré **positif** pour *Brettanomyces bruxellensis* si une valeur de Ct ≥ 10 est obtenue pour le fluorophore FAM.

Si aucune valeur n'est obtenue pour le Ct_{FAM} (Ct_{FAM} = N/A), l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne :

- Un échantillon est considéré **négatif** pour *Brettanomyces bruxellensis* si aucune valeur de Ct n'est obtenue pour le fluorophore FAM (Ct_{FAM}=N/A) et si le Ct du contrôle interne est supérieur ou égal à 28. ($Ct_{HEX} \geq 28$).
- Une valeur N/A pour le Ct_{HEX} du contrôle interne indique, lorsque le Ct_{FAM} de la cible est également N/A, qu'un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR a probablement eu lieu. Dans ce cas, l'échantillon d'ADN doit être dilué (au $1/10^e$ par exemple) en eau distillée stérile, puis soumis à une nouvelle PCR.
- Si le Ct_{HEX} du contrôle interne est inférieur à 28 il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été correctement placé ou que la courbe brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle. Si la courbe observée n'est pas correcte il sera nécessaire de répéter le test PCR pour cet échantillon.

Interprétation des résultats obtenus sur les échantillons :

Détection de *Brettanomyces bruxellensis* (FAM)	Détection du contrôle interne	Interprétation
Ct ≥ 10***	Non significatif	Positif
Ct = N/A	$Ct_{HEX} \geq 28$	Négatif
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibition**

*** : En cas de valeur nulle pour un échantillon et son contrôle interne (Ct = N/A), l'analyse doit être renouvelée avec l'échantillon d'ADN dilué (au 1/5e ou au 1/10e par exemple).*

**** : Il peut arriver qu'une valeur inférieure à 10 soit obtenue, vérifier que la courbe en tant que donnée brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (ligne de base plate, puis augmentation régulière de la fluorescence, suivi par un plateau). Si la courbe observée est correcte, on peut considérer l'échantillon positif pour la présence de Brettanomyces bruxellensis. Dans le cas contraire, l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne, comme il est expliqué dans les paragraphes ci-dessus.*

12 - PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLÉES

Il est possible d'utiliser le test VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit pour la confirmation de colonies isolées sur gélose.

1. Piquer une colonie isolée, à partir d'un milieu sélectif ou non, à l'aide d'un cure-dent ou d'une œse de 1 µl, ou autre consommable adapté (cône pipette par exemple).
2. Resuspendre la colonie dans 100 µl de R2 dans un tube de type Eppendorf (il est possible de resuspendre la colonie dans de l'eau physiologique stérile, l'efficacité PCR peut alors être affectée). Bien homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
3. Déposer 5 µl de la suspension dans 45 µl du mélange réactionnel PCR (Cf. partie 9.2 PCR en temps réel) et suivre le reste de la méthode VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit pour l'obtention et l'interprétation des résultats. ***Note : seule une analyse qualitative est réalisée à partir de la PCR effectuée sur cette suspension. Le signal obtenu en PCR est souvent très élevé car la quantité de cellules prélevées et analysées par PCR avec cette méthode est très importante.***

13 - PERFORMANCES DU TEST ET VALIDATIONS

Le test VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit est spécifique pour la détection de *Brettanomyces bruxellensis*. Il est possible de détecter la levure à partir de :

- 500 CFU/mL de vin avec le protocole d'extraction d'ADN décrit dans le VINEO™ Extract DNA Kit : sur 1,8 mL pour un moût en fermentation ou un vin chargé en cours de vinification ou d'élevage et
- 10 CFU/mL de vin selon le protocole partant de 45 mL pour un vin peu chargé, proche de l'embouteillage ou déjà mis en bouteille dont l'analyse nécessite un niveau de sensibilité analytique élevé.

 © 2010 Bio-Rad

ANNEXE A - TABLEAU DE PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL D'AMPLIFICATION PCR

Utiliser ce tableau pour déterminer les quantités nécessaires de sondes fluorescentes et solution d'amplification pour préparer le mélange réactionnel de PCR. **Le calcul du nombre d'échantillons doit inclure les 2 contrôles positifs Qs PCR et le contrôle négatif.**

Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL) (Bouchon rose)	Solution d'amplification (µL) (Bouchon blanc)	Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL) (Bouchon rose)	Solution d'amplification (µL) (Bouchon blanc)
1	5	40	49	265	2117
2	11	86	50	270	2160
3	16	130	51	275	2203
4	22	173	52	281	2246
5	27	216	53	286	2290
6	32	259	54	292	2333
7	38	302	55	297	2376
8	43	346	56	302	2419
9	49	389	57	308	2462
10	54	432	58	313	2506
11	59	475	59	319	2549
12	65	518	60	324	2592
13	70	562	61	329	2635
14	76	605	62	335	2678
15	81	648	63	340	2722
16	86	691	64	346	2765
17	92	734	65	351	2808
18	97	778	66	356	2851
19	103	821	67	362	2894
20	108	864	68	367	2938
21	113	907	69	373	2981
22	119	950	70	378	3024
23	124	994	71	383	3067
24	130	1037	72	389	3110
25	135	1080	73	394	3154
26	140	1123	74	400	3197
27	146	1166	75	405	3240
28	151	1210	76	410	3283
29	157	1253	77	416	3326
30	162	1296	78	421	3370
31	167	1339	79	427	3413
32	173	1382	80	432	3456
33	178	1426	81	437	3499
34	184	1469	82	443	3542
35	189	1512	83	448	3586
36	194	1555	84	454	3629
37	200	1598	85	459	3672
38	205	1642	86	464	3715
39	211	1685	87	470	3758
40	216	1728	88	475	3802
41	221	1771	89	481	3845
42	227	1814	90	486	3888
43	232	1858	91	491	3931
44	238	1901	92	497	3974
45	243	1944	93	502	4018
46	248	1987	94	508	4061
47	254	2030	95	513	4104
48	259	2074	96	518	4147

© 2010 Bio-Rad

ANNEXE B

PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LES THERMOCYCLEURS Chromo4™/CFX96™

Les 3 premiers puits de la colonne 1 peuvent être utilisés pour analyser les 3 points de contrôles. Les autres puits de la plaque seront utilisés pour déposer les échantillons à analyser.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QS											
B	QS											
C	NC											
D	Echantillons											
E	Echantillons											
F	…											
G												
H												

NC : Contrôle négatif PCR
QS : Contrôle positif Qs PCR

ANNEXE C

PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE THERMOCYCLEUR MiniOpticon™

Les 3 premiers puits de la colonne 1 peuvent être utilisés pour analyser les 3 points de contrôles. Les autres puits de la plaque seront utilisés pour déposer les échantillons à analyser.

	1	2	3	4	5	6
A	QS					
B	QS					
C	NC					
D	Echantillons					
E	Echantillons					
F	…					
G						
H						

NC : Contrôle négatif PCR
QS : Contrôle positif Qs PCR

 © 2010 Bio-Rad

AVIS CONCERNANT L'ACHETEUR : LICENCE LIMITEE

L'utilisation de ce produit est couverte par un ou plusieurs des brevets US suivants et les revendications de brevet correspondantes hors Etats-Unis : 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (revendications 1 à 23 seulement) et 5 773 258 (revendications 1 et 6 seulement) et par les revendications hors Etats-Unis correspondant au brevet US n° 4 889 818. L'achat de ce produit comprend une immunité de poursuite restreinte et non transférable selon les revendications de brevet précédentes lorsque cette quantité de produit est uniquement utilisée à des fins d'analyse alimentaire, d'analyse environnementale et en microbiologie industrielle, y compris la publication des résultats des activités de l'acheteur moyennant paiement ou toute autre contrepartie commerciale, et lorsqu'elle est également utilisée aux fins des propres recherches de l'acheteur. Aucun droit selon une quelconque revendication de brevet (comme les revendications de la méthode 5'-nucléase dans les brevets US n° 5 210 015 et 5 487 972) n'est expressément cédé, que ce soit par implication ou par préclusion. De plus amples informations concernant l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le Directeur des Licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Californie, 94404, Etats-Unis.

 © 2010 Bio-Rad

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Ref.: 354-8101

Instrucciones de uso

Prueba para la detección y cuantificación mediante PCR en tiempo real de *Brettanomyces bruxellensis*

© 2010 Bio-Rad

ÍNDICE

1 - INTRODUCCIÓN

2 - PRINCIPIO DEL Kit VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit

3 - COMPOSICIÓN DEL KIT

4 - CADUCIDAD Y CONSERVACIÓN

5 - EQUIPO Y MATERIAL NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

6 - PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

7 - EXTRACCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

8 - EXTRACCIÓN DEL ADN

9 - PCR EN TIEMPO REAL

10 - ANÁLISIS DE DATOS

11 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

12 - PROTOCOLO DE CONFIRMACIÓN A PARTIR DE COLONIAS AISLADAS

13 - RENDIMIENTOS DE LA PRUEBA Y VALIDACIONES

ANEXO A. TABLA DE PREPARACIÓN DE LA MEZCLA REACTIVA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

ANEXO B. PLAN DE PLACA PARA LOS TERMOCICLADORES Chromo4™ O CFX96™

ANEXO C. PLAN DE PLACA PARA EL TERMOCICLADOR MiniOpticon™

 © 2010 Bio-Rad

1 - INTRODUCCIÓN

La *Brettanomyces bruxellensis* es una levadura responsable de la presencia de 4-etil fenol y 4-etil guayacol en bebidas como los vinos, los zumos de frutas y las cervezas que causan pérdidas económicas importantes. Resulta difícil detectar su presencia en los vinos mediante los métodos de cultivo clásicos, que son largos y no específicos.

Sin embargo, la detección rápida, específica y precoz de esta levadura en el proceso de elaboración de los vinos permitiría al enólogo y al productor tomar medidas de prevención y eliminarla antes de la aparición del carácter fenolado característico de la alteración provocada por esta levadura. Frente al método microbiológico tradicional, la biología molecular ofrece soluciones de detección con elevados niveles de rapidez, sensibilidad y especificidad.

El diagnóstico de la presencia de esta levadura debe permitir determinar el nivel de riesgo en que se encuentra el vino y cómo evoluciona dicho riesgo con el tiempo. El riesgo varía según el nivel de contaminación del vino. Así pues, una herramienta de cuantificación adaptada permite determinar si: a) existe una pequeña población y, por tanto, el riesgo es bajo o está controlado; b) existe una población intermedia o crítica, en cuyo caso el vino debe ser vigilado, es necesario hacer un seguimiento de forma regular y puede tratarse el vino; o c) la población es considerable, en cuyo caso también lo es el riesgo de producción de fenoles volátiles, y se requiere actuar de forma inmediata y urgente sobre el vino.

En todos los casos se recomienda realizar un seguimiento regular. Es importante seguir la evolución de las *Brettanomyces bruxellensis* en el vino.

El kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit es una prueba cuantitativa que permite detectar de forma específica la *Brettanomyces bruxellensis* en los vinos y mostos en fermentación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Se amplifica y detecta simultáneamente una secuencia de ADN específica de la *Brettanomyces bruxellensis* gracias a una sonda fluorescente. La aplicación de esta prueba permite obtener un resultado cuantitativo en menos de 3 h tras la extracción de ADN (VINEO™ Extract DNA Kit, 354-8100). Los softwares diseñados para este análisis Opticon Monitor™ o CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition permiten la monitorización del riesgo derivado de la presencia de *Brettanomyces bruxellensis* en la muestra de vino analizada. Además, se ofrece al usuario una interpretación del nivel de riesgo en relación con el número de UFC/mL-1 (unidades formadoras de colonias) detectado en el vino:

- Negativo
- Población pequeña, riesgo controlado
- Población crítica que debe vigilarse
- Población muy elevada, riesgo de producción de fenoles volátiles

El kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit puede usarse asimismo de modo cualitativo para confirmar colonias aisladas a partir de un medio de cultivo.

2 - PRINCIPIO DEL Kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Esta prueba se basa en la amplificación, detección y cuantificación de secuencias de ADN mediante la técnica de PCR en tiempo real. Utiliza cebadores y una sonda de ADN específicos de la *Brettanomyces bruxellensis*. La detección y el análisis de los resultados se optimizan para el uso con un termociclador para PCR en tiempo real de Bio-Rad, como el MiniOpticon™, el Chromo4™ o el CFX96™.

Durante la reacción de la PCR, los cebadores se hibridan en la región objetivo y después, catalizados por la polimerasa, se extienden en sentido 5'-3' utilizando los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) presentes en la mezcla reactiva, creando de este modo una secuencia complementaria de ADN llamada «amplicón».

Durante la PCR, se hibridan con los amplicones sondas oligonucleotídicas específicas de la secuencia objetivo. Dichas sondas, marcadas mediante fluoróforos, sólo emiten fluorescencia cuando se produce la hibridación. La sonda que se une a la secuencia objetivo de *Brettanomyces bruxellensis* se marca con un fluoróforo específico. La intensidad de la fluorescencia aumenta en proporción a la cantidad de productos de amplificación en el tubo de PCR. El módulo óptico del termociclador mide directamente la fluorescencia generada de este modo.

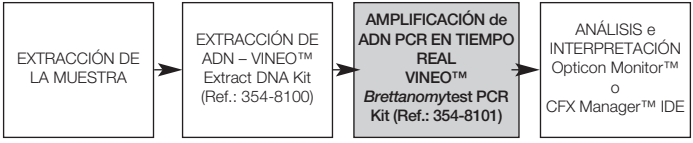
A cada reacción se añade un ADN sintético llamado «control interno» que se amplifica a la vez que las secuencias objetivo de *Brettanomyces bruxellensis* pero es detectado por una sonda marcada con un segundo fluoróforo. Este control interno permite evidenciar un posible fenómeno de inhibición de la reacción.

El software asociado al aparato calcula automáticamente la relación entre la intensidad de la fluorescencia y el ciclo de amplificación. Esta relación indica la presencia o ausencia de *Brettanomyces bruxellensis* en la muestra.

Los resultados obtenidos mediante amplificación de este DNA son analizados por los softwares Opticon Monitor™ o CFX Manager™ IDE que han sido programados para realizar análisis cuantitativos y automáticos. Entonces se ofrece al usuario una interpretación del riesgo relacionado con la presencia de *Brettanomyces bruxellensis*.

 © 2010 Bio-Rad

Esta prueba permite detectar y cuantificar la *Brettanomyces bruxellensis* en los ADN extraídos a partir de bebidas fermentadas procedentes de la uva y de mostos en fermentación.


EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA
EXTRACCIÓN DE ADN – VINEO™ Extract DNA Kit (Ref.: 354-8100)
AMPLIFICACIÓN de ADN PCR EN TIEMPO REAL VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit (Ref.: 354-8101)
ANÁLISIS e INTERPRETACIÓN Opticon Monitor™ o CFX Manager™ IDE

3 - COMPOSICIÓN DEL KIT

Este kit contiene la cantidad de reactivos necesaria para 96 reacciones.

Tapones	Denominación	Reactivo	Volumen
Rosa	Fluorescent probes	Sondas fluorescentes	1 tubo (0,55 mL)
Blanco	Amplification mix	Solución de amplificación	2 tubos (2 x 2,2 mL)
Verde	Negative PCR control	Control negativo PCR	1 tubo (0,5 mL)
Rojo	Positive Qs PCR control	Control positivo Qs PCR	1 tubo (0,5 mL)

4 - CADUCIDAD Y CONSERVACIÓN

Desde el momento de su recepción, el kit debe conservarse entre +2 °C y +8 °C. Cada reactivo conservado entre +2 °C y +8 °C puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en el tubo.

Nota: *No congelar los reactivos.*

5 - EQUIPO Y MATERIAL NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Equipo:

- Industrial Diagnostic CFX96™ para la PCR en tiempo real, bloque reactivo de 96 pocillos, ref. Bio-Rad: 359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, ref. Bio-Rad: 359-3893
- Sistema MiniOpticon™ para la PCR en tiempo real, bloque reactivo de 48 pocillos; ref. Bio-Rad: 359-3995
- Vórtex
- Opcional: centrífuga con rotor para placa o tira de tubos (máx. 2000 x g)
- Micropipetas de 20 µl, 200 µl y 1000 µl
- Dispensador múltiple, como pipetas Combitip

Observación: Recomendamos utilizar un ondulador eléctrico con el termociclador.

Consumibles:

- Para las placas, tubos PCR y tapones:
  - Placas blancas de 96 pocillos de perfil bajo; ref. Bio-Rad: MLL-9651
  - Placas blancas de 48 pocillos de perfil bajo; ref. Bio-Rad: MLL-4851
  - Tiras de 8 tubos de 200µl de perfil bajo, ref. Bio-Rad: TLS-0851
  - Tiras de 8 tapones ópticos planos para tubos o placas de pocillos de 0,2 mL, 120 tiras, ref. Bio-Rad : TCS-0803
- Conos para Combitip o dispensador múltiple, estériles y envasados de forma individual
- Conos con filtro estériles, adaptables a micropipetas de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Tubos estériles de 2 mL y de 5 mL
- Guantes de látex o nitrilo sin polvo
- Agua destilada estéril
- Lejía diluida al 5 %
- Agente descontaminante, como DNA AWAY® o RNAse AWAY®

6 - PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

- El ensayo debe ser realizado por personas que hayan recibido una formación adecuada.
- La calidad de los resultados depende de que se cumplan escrupulosamente las buenas prácticas de laboratorio, en especial en lo referente a la PCR:
  - El material (pipetas, tubos, etc.) no debe cambiarse de puesto de trabajo.
  - Es indispensable utilizar un control positivo y otro negativo para cada serie de reacciones de amplificación.
  - No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
  - Agitar con vórtex los reactivos del kit antes de utilizarlos para trabajar con soluciones homogéneas.
  - Comprobar la exactitud y la precisión de las pipetas, así como el correcto funcionamiento del instrumental.
  - Cambiarse los guantes de forma regular y en cuanto se sospeche que puedan estar contaminados.
  - Limpiar regularmente las superficies de trabajo con lejía diluida al 5 % y otro agente limpiador, como DNA AWAY® o RNase AWAY®.
  - Usar guantes sin polvo para no dejar huellas de dedos en la lámina óptica empleada para sellar las microplacas. No escribir en los tapones de los tubos para PCR. En ambos casos, puede dificultar el registro de datos por parte del aparato.

 © 2010 Bio-Rad

Recomendamos encarecidamente leer el protocolo completo antes de comenzar el ensayo.
Cumpla escrupulosamente el protocolo propuesto.

7 - EXTRACCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras de vino se recogen, en condiciones asépticas, en recipientes estériles de vidrio, polietileno o de otro material parecido.
Las muestras deben enviarse al laboratorio lo más rápidamente posible, preferentemente antes de 24 horas y no más de 48 horas tras su extracción.
Si las muestras se transportan y analizan en un plazo de 24 horas, el transporte y almacenamiento se realizan a temperatura ambiente (entre +18 C y +30 C).
Si las muestras se transportan y analizan en un plazo de 48 horas, el transporte y almacenamiento se realizan a una temperatura de entre +2 C y +8 C.

8 - EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN debe realizarse con el kit VINEO™ Extract DNA Kit (ref. Bio-Rad 354-8100), desarrollado por Bio-Rad para la extracción de ADN a partir de muestras de vino.

9 - PCR EN TIEMPO REAL

1. Puesta en marcha de la máquina de PCR

Encender, por este orden, el termociclador y el ordenador y, a continuación, abrir el software Opticon Monitor. Encontrará más información y la definición de los parámetros del software en el manual del usuario del termociclador Bio-Rad para el kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

2. Preparación de las reacciones de PCR

2.1 Preparar la mezcla reactiva del kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit con 40 µL/muestra de la **solución de amplificación** (tubo con tapón blanco) y 5 µL/muestra de **sondas fluorescentes** (tubo con tapón rosa). Hacer mezcla reactiva en función del número de muestras y de controles que se desee analizar, teniendo en cuenta que por cada placa deben usarse como mínimo 1 duplicado (2) del control positivo Qs PCR y un control negativo. La tabla de preparación de la mezcla reactiva de amplificación por PCR, incluida en el **Anexo A**, indica las cantidades de cada reactivo que deben mezclarse en función del número de muestras que se desee analizar. No olvide contar los 3 puntos de control.
Nota: No mezclar lotes de reactivos.

2.2 Una vez preparada, la mezcla reactiva (soluciones de amplificación y sondas) debe utilizarse inmediatamente, o bien puede conservarse durante **2 horas entre +2 °C y +8 °C**.

2.3 Repartir **45 µL** de esta mezcla reactiva por pocillos, según el plan de placa definido. En los **Anexos B y C** se proponen planes de placa para los termocicladores Chromo4™/CFX96™ y MiniOpticon™, respectivamente.

Añadir **5 µL** de muestra, de control negativo o de control positivo Qs PCR y sellar herméticamente los pocillos de la placa o de las tiras. Es importante insistir en el cierre de los pocillos y de las tiras de pocillos para evitar toda posible evaporación durante la PCR.
Es importante asimismo evitar la presencia de burbujas en el fondo de los pocillos; para ello deberá pipetearse con cuidado. Para eliminar las burbujas una vez sellada la placa o cerradas las tiras de pocillos para PCR, éstas pueden centrifugarse brevemente. La placa puede conservarse durante **2 horas entre +2 °C y +8 °C**.

2.4 Colocar la placa o las tiras para PCR en el termociclador. Asegurarse de que estén orientadas correctamente (pocillos A1 en la parte superior izquierda).
Cerrar el módulo reactivo.

3. Inicio de la reacción de amplificación
Para iniciar la PCR, consulte el manual del usuario del termociclador Bio-Rad para el kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

10 - ANÁLISIS DE DATOS
El análisis de los datos puede realizarse directamente al final de la reacción de amplificación o posteriormente, reabriendo el fichero de datos. Para abrir los ficheros de datos y analizar los resultados de la PCR, consulte el manual del usuario del termociclador Bio-Rad para el kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

11 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
Para obtener los resultados del análisis, basta con leer los valores Ct (del inglés «cycle threshold», 'ciclo umbral'): valor del ciclo de amplificación a partir del cual la fluorescencia se eleva significativamente por encima del ruido de fondo.

 © 2010 Bio-Rad

El análisis manual permitirá únicamente un análisis cualitativo (presencia o ausencia).

Para una interpretación automática es necesario utilizar el software Opticon Monitor™ (versión 3.3 y posteriores) o el software CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition. Será posible imprimir un informe completo (ver instrucciones de software).

1. Controles
Antes de la interpretación final de los resultados es necesario verificar los resultados de los controles positivo y negativo.

Para que la prueba sea válida, los resultados de los controles positivo y negativo deberán ser los siguientes:

	Detección de *Brettanomyces bruxellensis* (FAM)	**Detección del control interno (Canal HEX)**
Control negativo	Ct = N/A*	25 ≤ Ct ≤ 40
Control positivo Qs PCR	27 ≤ Ct ≤ 37	No significativo

** N/A significa «no aplicable»: el software indica «N/A» para el Ct de una muestra cuando la curva de fluorescencia no supera el umbral.*

Si los resultados de los controles positivos Qs PCR y negativo son distintos de los descritos en la tabla anterior, es necesario repetir la PCR desde el principio.

2. Muestras
Una muestra se considera **positiva** en *Brettanomyces bruxellensis* si se obtiene un valor Ct ≥ 10 para el fluoróforo FAM.

Si no se obtiene ningún valor para el Ct_{FAM} (Ct_{FAM} = N/A), la interpretación del resultado depende del valor del control interno:

- Una muestra se considera **negativa** en *Brettanomyces bruxellensis* si no se ha obtenido ningún valor de Ct para el fluoróforo FAM (Ct_{FAM}=N/A) y el Ct del control interno es igual o superior a 28 ($Ct_{HEX} \geq 28$).
- Un valor N/A para el Ct_{HEX} del control interno indica, cuando el Ct_{FAM} del objetivo también es N/A, que probablemente se ha producido un fenómeno de inhibición de la PCR. En este caso, la muestra de ADN debe ser diluida (por ejemplo en relación 1:9) en agua destilada estéril y para luego someterla a una nueva PCR.

- Si el Ct_{HEX} del control interno es inferior a 28, no es posible interpretar el resultado. Comprobar que se haya colocado el umbral correctamente o que la curva bruta muestre un aspecto característico de amplificación exponencial. Si la curva observada no es correcta, será necesario repetir la prueba de PCR para esa muestra.

Interpretación de los resultados obtenidos con las muestras:

Detección de *Brettanomyces bruxellensis* (FAM)	Detección del control interno	Interpretación
Ct ≥ 10***	No significativo	Positivo
Ct = N/A	Ct_{HEX} ≥ 28	Negativo
Ct = N/A	Ct = N/A	Inhibición**

***: En caso de valor nulo en una muestra y su control interno (Ct = N/A), el análisis debe repetirse con la muestra de ADN diluida (por ejemplo, en relación 1:4 o 1:9).*
****: Puede ocurrir que se obtenga un valor inferior a 10. En ese caso, hay que comprobar que la curva de datos brutos muestre un aspecto característico de amplificación exponencial (línea de base plana seguida de aumento regular de la fluorescencia hasta llegar a una meseta). Si la curva observada es correcta, puede considerarse que la muestra es positiva en Brettanomyces bruxellensis. En caso contrario, la interpretación del resultado depende del valor del control interno, según lo explicado en los párrafos anteriores.*

12 - PROTOCOLO DE CONFIRMACIÓN A PARTIR DE COLONIAS AISLADAS

Es posible utilizar la prueba VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit para confirmar colonias aisladas en agar.

1. Pinchar la colonia aislada, ya sea a partir de un medio selectivo o no, con ayuda de un palillo, un asa de siembra de 1 µL u otro consumible adecuado (p. ej. un cono de pipeta).

2. Volver a suspender la colonia en 100 µl de R2 en un tubo Eppendorf (es posible para volver a suspender la colonia en agua fisiológica estéril, la eficiencia de PCR pueden ser afectadas). Homogeneizar bien la suspensión en un vórtex.

3. Poner 5 µL de la suspensión en 45 µL de la mezcla reactiva de la PCR (véase apartado 9.2 PCR en tiempo real) y seguir el resto del método del kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit para obtener e interpretar los resultados. ***Nota: Sólo se realiza un análisis cualitativo a partir de la PCR efectuada con esta suspensión. A menudo, la señal obtenida con la PCR es muy elevada debido a que la cantidad de células extraídas y analizadas mediante PCR con este método es muy grande.***

 © 2010 Bio-Rad

13 - RENDIMIENTOS DE LA PRUEBA Y VALIDACIONES

La prueba VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit es específica para la detección de la *Brettanomyces bruxellensis*. La levadura puede detectarse a partir de:

- 500 UFC/mL de vino con el protocolo de extracción de ADN descrito en el kit VINEO™ Extract DNA Kit: 1,8 mL para un mosto en fermentación o un vino pesado durante la vinificación o la crianza.
- 10 UFC/mL de vino según el protocolo: 45 mL para un vino poco pesado, próximo al embotellado o ya embotellado cuyo análisis precise de un nivel elevado de sensibilidad analítica.

© 2010 Bio-Rad

ANEXO A
TABLA DE PREPARACIÓN DE LA MEZCLA REACTIVA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

Utilizar esta tabla para determinar las cantidades de sondas fluorescentes y solución de amplificación necesarias para preparar la mezcla reactiva de la PCR. **En el cálculo del número de muestras deben incluirse los 2 controles positivos Qs PCR y el control negativo**.

Número de muestras	Sondas fluorescentes (µL) (Tapón rosa)	Solución de amplificación (µL) (Tapón blanco)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1037
25	135	1080
26	140	1123
27	146	1166
28	151	1210
29	157	1253
30	162	1296
31	167	1339
32	173	1382
33	178	1426
34	184	1469
35	189	1512
36	194	1555
37	200	1598
38	205	1642
39	211	1685
40	216	1728
41	221	1771
42	227	1814
43	232	1858
44	238	1901
45	243	1944
46	248	1987
47	254	2030
48	259	2074

Número de muestras	Sondas fluorescentes (µL) (Tapón rosa)	Solución de amplificación (µL) (Tapón blanco)
49	265	2117
50	270	2160
51	275	2203
52	281	2246
53	286	2290
54	292	2333
55	297	2376
56	302	2419
57	308	2462
58	313	2506
59	319	2549
60	324	2592
61	329	2635
62	335	2678
63	340	2722
64	346	2765
65	351	2808
66	356	2851
67	362	2894
68	367	2938
69	373	2981
70	378	3024
71	383	3067
72	389	3110
73	394	3154
74	400	3197
75	405	3240
76	410	3283
77	416	3326
78	421	3370
79	427	3413
80	432	3456
81	437	3499
82	443	3542
83	448	3586
84	454	3629
85	459	3672
86	464	3715
87	470	3758
88	475	3802
89	481	3845
90	486	3888
91	491	3931
92	497	3974
93	502	4018
94	508	4061
95	513	4104
96	518	4147

 © 2010 Bio-Rad

ANEXO B

PLAN DE PLACA PARA LOS TERMOCICLADORES Chromo4™/CFX96™

Los 3 primeros pocillos de la columna 1 pueden usarse para analizar los 3 puntos de control. Los demás pocillos de la placa se usarán para colocar las muestras que se desee analizar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QS											
B	QS											
C	NC											
D	Muestra											
E	Muestra											
F	…											
G												
H												

CN: Control negativo PCR

QS: Control positivo Qs PCR

ANEXO C

PLAN DE PLACA PARA EL TERMOCICLADOR MiniOpticon™

Los 3 primeros pocillos de la columna 1 pueden usarse para analizar los 3 puntos de control. Los demás pocillos de la placa se usarán para colocar las muestras que se desee analizar.

	1	2	3	4	5	6
A	QS					
B	QS					
C	NC					
D	Muestra					
E	Muestra					
F	…					
G						
H						

CN: Control negativo PCR

QS: Control positivo Qs PCR

AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto está protegido por una o más de las siguientes patentes de EE. UU. y las reivindicaciones de patentes correspondientes fuera de Estados Unidos: 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (sólo reivindicaciones de la 1 a la 23) y 5 773 258 (sólo reivindicaciones de la 1 a la 6) y las reivindicaciones fuera de EE.UU. correspondientes a la patente n° 4 889 818 de EE. UU. La adquisición de este producto incluye inmunidad judicial restringida e intransferible según las anteriores reivindicaciones de patentes cuando esta cantidad de producto se use únicamente con fines de análisis alimentario, análisis medioambiental y en microbiología industrial, incluida la publicación de los resultados de las actividades del comprador por medio del pago o toda contrapartida comercial, cuando se utilice para los fines de las propias investigaciones del comprador. No se cede de forma expresa ningún derecho a cualquier reivindicación de patente (como las reivindicaciones del método de la 5' nucleasa en las patentes n° 5 210 015 y 5 487 972 de EE. UU.), ya sea por implicación o por preclusión. Puede obtenerse más información respecto a la compra de licencias poniéndose en contacto con el Director de Licencias, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, EE. UU.

 © 2010 Bio-Rad

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Rif.: 354-8101

Istruzioni per l'uso

Test per la rilevazione e la quantificazione mediante PCR in tempo reale di *Brettanomyces bruxellensis*

© 2010 Bio-Rad

SOMMARIO

1 - INTRODUZIONE

2 - PRINCIPIO DEL VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

3 - COMPOSIZIONE DEL KIT

4 - PERIODO DI VALIDITÀ E CONSERVAZIONE

5 - ATTREZZATURA E MATERIALE NECESSARI NON FORNITI

6 - PRECAUZIONI E RACCOMANDAZIONI

7 - PRELIEVO E TRASPORTO DEI CAMPIONI

8 - ESTRAZIONE DEL DNA

9 - PCR IN TEMPO REALE

10 - ANALISI DEI DATI

11 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

12 - PROTOCOLLO DI CONFERMA A PARTIRE DA COLONIE ISOLATE

13 - PRESTAZIONI DEL TEST E VALIDAZIONI

ALLEGATO A - TABELLA DI PREPARAZIONE DELLA MISCELA DI REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE PCR

ALLEGATO B - PIANO DI PIASTRA DA UTILIZZARE SUI TERMOCICLATORI Chromo4™ O CFX96™

ALLEGATO C - PIANO DI PIASTRA DA UTILIZZARE SUL TERMOCICLATORE MiniOpticon™

 © 2010 Bio-Rad

1 - INTRODUZIONE

Brettanomyces bruxellensis è un lievito responsabile della presenza di 4-etilfenolo e 4 etilguaiacolo nelle bevande quali vini, succhi di frutta e birre che comporta importanti perdite a livello economico. Nei vini, la sua presenza è difficile da rilevare attraverso i metodi di coltura classici, che sono lunghi e non specifici.

La rilevazione rapida, specifica e precoce di questo lievito nel procedimento di elaborazione dei vini consentirebbe tuttavia all'enologo e al produttore di adottare delle misure preventive e di eliminarlo prima della comparsa del carattere fenolato, caratteristico dell'alterazione causata da questo lievito. In confronto al metodo microbiologico tradizionale, la biologia molecolare apporta soluzioni di rilevazione ad alti livelli di rapidità, di sensibilità e di specificità.

La diagnosi della presenza di questo lievito deve permettere di determinare a che livello di rischio si trova il vino e come tale rischio evolve nel tempo. Questo rischio varia a seconda del livello di contaminazione del vino. Pertanto uno strumento di quantificazione adatto permette di determinare se (i) la popolazione è in quantità bassa e quindi il rischio è basso, cioè controllato, (ii) in quantità intermedia o critica, in questo caso il vino deve essere sorvegliato, si impone un controllo regolare, il vino può essere trattato (iii) e, infine, se la popolazione è molto importante, e in questo caso lo è anche il rischio di produzione dei fenoli volatili, si impone un'azione immediata e urgente sul vino.

In tutti i casi si consiglia un follow-up regolare. È importante seguire l'evoluzione dei *Brettanomyces bruxellensis* nel vino.

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit è un test quantitativo che permette la rilevazione specifica di *Brettanomyces bruxellensis* nei vini e nei mosti in fermentazione mediante la tecnica di polimerizzazione a catena in tempo reale (RT-PCR). Una sequenza di DNA specifica di *Brettanomyces bruxellensis* viene amplificata e rilevata simultaneamente grazie ad una sonda fluorescente. La realizzazione di questo test permette di ottenere un risultato quantitativo in meno di 3 ore dopo l'estrazione di DNA (VINEO™ Extract DNA Kit, 354-8100). Il software di analisi adatto a questo test, Opticon Monitor™ oppure CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition, consente, attraverso un'analisi automatica e quantitativa, di misurare il rischio *Brettanomyces bruxellensis* nel campione di vino analizzato. All'utilizzatore viene proposta anche un'interpretazione del livello di rischio. Quest'ultima è correlata al numero di UFC.ml-1 (Unità Formanti Colonia) rilevate nel vino:

- Negativo
- Popolazione bassa, rischio controllato
- Popolazione critica, da tenere sotto controllo
- Popolazione molto elevata, rischio di produzione di Fenoli volatili

VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit può essere utilizzato anche in modalità qualitativa per la conferma di colonie isolate a partire dal mezzo di coltura.

2 - PRINCIPIO DEL VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit

Questo test si basa sull'amplificazione, la rilevazione e la quantificazione di sequenze di DNA mediante la tecnica di PCR in tempo reale. Utilizza dei primer e una sonda da DNA specifici per *Brettanomyces bruxellensis*. La rilevazione e l'analisi dei risultati sono ottimizzate per l'utilizzazione con un termociclatore per la PCR in tempo reale Bio-Rad, quale il MiniOpticon™, il Chromo4™ o il CFX96™.

Durante la reazione di PCR, i primer si ibrideranno alla regione bersaglio poi, catalizzati mediante polimerasi, si allungheranno nelle direzioni 5'-3' utilizzando i desossinucleotidi trifosfati (dNTP) presenti nella miscela di reazione, creando in questo modo una sequenza complementare di DNA, detta amplicon.

Durante la PCR, sonde oligonucleotidiche, specifiche della sequenza bersaglio, si ibrideranno agli amplicon. Queste sonde, marcate con fluorofori, emettono fluorescenza solo quando ha luogo l'ibridazione. La sonda che si lega alla sequenza bersaglio di *Brettanomyces bruxellensis* è marcata con un fluoroforo specifico. L'intensità di fluorescenza aumenta proporzionalmente all'aumento della quantità dei prodotti di amplificazione nella provetta di PCR. La fluorescenza così generata viene misurata direttamente attraverso il modulo ottico del termociclatore.

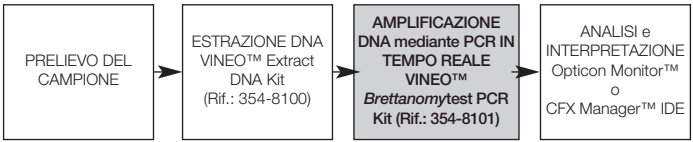
Ad ogni reazione viene aggiunto un DNA sintetico chiamato "Controllo interno". Viene amplificato simultaneamente alle sequenze bersaglio di *Brettanomyces bruxellensis*, ma rilevato mediante una sonda marcata con un secondo fluoroforo. Consente di evidenziare un eventuale fenomeno di inibizione della reazione.

Il software associato all'apparecchio calcola automaticamente la relazione tra l'intensità della fluorescenza e il ciclo di amplificazione. Questa relazione indica la presenza, o l'assenza, di *Brettanomyces bruxellensis* nel campione.

I risultati ottenuti per l'amplificazione di questi DNA sono analizzati dal software Opticon Monitor™ oppure CFX Manager™ programmati per eseguire un'analisi automatica e quantitativa. Viene allora proposta all'utilizzatore un'interpretazione relativa al rischio correlato alla presenza di *Brettanomyces bruxellensis*.

 © 2010 Bio-Rad

Questo test consente la rilevazione e la quantificazione di *Brettanomyces bruxellensis* nei DNA estratti a partire da bevande fermentate ottenute da uva e dai mosti in fermentazione.


PRELIEVO DEL CAMPIONE
ESTRAZIONE DNA VINEO™ Extract DNA Kit (Rif.: 354-8100)
AMPLIFICAZIONE DNA mediante PCR IN TEMPO REALE VINEO™ *Brettanomyces*test PCR Kit (Rif.: 354-8101)
ANALISI e INTERPRETAZIONE Opticon Monitor™ o CFX Manager™ IDE

3 - COMPOSIZIONE DEL KIT

Tappi	Designazione	Reagente	Volume
Rosa	Fluorescent probes	Sonde fluorescenti	1 provetta (0,55 ml)
Bianco	Amplification mix	Soluzione di amplificazione	2 provette (2 x 2,2 ml)
Verde	Negative PCR control	Controllo negativo PCR	1 provetta (0,5 ml)
Rosso	Positive Qs PCR control	Controllo positivo Qs PCR	1 provetta (0,5 ml)

Questo kit contiene la quantità di reagente necessaria per 96 reazioni.

4 - PERIODO DI VALIDITÀ E CONSERVAZIONE

Dal momento della ricezione, il kit deve essere conservato ad una temperatura tra +2°C e +8°C. Ogni reagente conservato tra +2°C e +8°C può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata sulla provetta.
NB: *Non congelare i reagenti.*

5 - ATTREZZATURA E MATERIALE NECESSARI NON FORNITI

Attrezzature:

- Industrial Diagnostic CFX96™ per la PCR in tempo reale, blocco di reazione da 96 pozzetti, rif. Bio-Rad: 359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, rif. Bio-Rad : 359-3893
- Sistema MiniOpticon™ per la PCR in tempo reale, blocco di reazione da 48 pozzetti, rif. Bio-Rad: 359-3995
- Vortex
- Opzionale: centrifuga con rotore per piastra o barretta (max. 2000 x G)
- Micropipette da 20 µl, 200 µl e 1000 µl
- Multidispensatore, quale pipette combitip

Nota: Consigliamo di utilizzare un ondulatore elettrico con il termociclatore.

© 2010 Bio-Rad

Materiali monouso:

- Per le piastre, provette per PCR e cappucci:
  - Piastre bianche da 96 pozzetti "Low-profile", rif. Bio-Rad: MLL-9651
  - Piastre bianche da 48 pozzetti "Low-profile", rif. Bio-Rad: MLL-4851
  - Barrette da 8 provette da 200 µl "Low-profile", rif. Bio-Rad: TLS-0851
  - Barrette da 8 cappucci ottici piatti, per provette o piastre per pozzetti da 0,2 ml, 120 barrette Rif. Bio-Rad: TCS-0803
- Coni per Combitip o multidispensatore, sterili confezionati individualmente
- Coni con filtro sterili, adattabili a micropipette da 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl e 1000 µl
- Provette sterili da 2 ml e da 5 ml
- Guanti non talcati in latice o nitrile
- Acqua distillata sterile
- Candeggina al 5%
- Agente decontaminante quale DNA AWAY® o RNAse AWAY®

6 - PRECAUZIONI E RACCOMANDAZIONI

- Questo test deve essere realizzato da persone che hanno ricevuto una formazione adeguata.
- La qualità dei risultati dipende dal rispetto scrupoloso delle Buone Prassi di Laboratorio, in particolare in materia di PCR:
  - Il materiale (pipette, provette, ecc....) non deve circolare da una postazione di lavoro all'altra.
  - È indispensabile utilizzare un controllo positivo e un controllo negativo per ogni serie di reazioni di amplificazione.
  - Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
  - Agitare con il vortex i reagenti del kit prima di utilizzarli in modo da lavorare con soluzioni omogenee.
  - Verificare l'accuratezza e la precisione delle pipette e il corretto funzionamento degli strumenti.
  - Sostituire i guanti regolarmente e ogniqualvolta si ritiene che possano essere contaminati.
  - Pulire regolarmente le superfici di lavoro con candeggina al 5% e altri agenti quali DNA AWAY® o RNase AWAY®.
  - Indossare guanti non talcati per non lasciare impronte sulla pellicola ottica utilizzata per chiudere le micropiastre. Non scrivere sui tappi delle provette PCR. In entrambi i casi, la registrazione dei dati da parte dell'apparecchio può risultare falsata.

 © 2010 Bio-Rad

Vi raccomandiamo vivamente di leggere l'intero protocollo prima di iniziare il test.
Rispettare scrupolosamente il protocollo proposto.

7 - PRELIEVO E TRASPORTO DEI CAMPIONI

I campioni di vini vengono prelevati, in condizioni di asepsi, in recipienti sterili di vetro, di polietilene o di materiale simile.
I campioni devono essere consegnati al laboratorio il più rapidamente possibile, preferibilmente entro le 24 ore e non oltre le 48 ore successive al prelievo. Se i campioni sono trasportati e analizzati entro 24 ore, il trasporto e la conservazione hanno luogo a temperatura ambiente (da +18°C a +30°C). Se i campioni vengono trasportati e analizzati entro le 48 ore, il trasporto e la conservazione hanno luogo ad una temperatura tra +2°C e +8°C.

8 - ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA va effettuata utilizzando il kit messo a punto da Bio-Rad per l'estrazione del DNA a partire da campioni di vino, VINEO™ Extract DNA kit (rif. Bio-Rad 354-8100).

9 - PCR IN TEMPO REALE

1. Accensione dell'apparecchio PCR

Accendere nell'ordine il termociclatore, il computer poi aprire il software Opticon Monitor. Per maggiori informazioni e per la definizione dei parametri del software consultare il manuale d'uso del termociclatore Bio-Rad per il kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

2. Preparazione delle reazioni PCR

2.1 Preparare la miscela di reazione VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit mescolando (40 µl/campione) della **soluzione di amplificazione** (provetta con il tappo bianco) e (5 µl/campione) delle **sonde fluorescenti** (provetta con il tappo rosa). Realizzare la miscela di reazione in funzione del numero di campioni e dei controlli da analizzare (devono essere utilizzati minimo 1 duplicato (2) del controllo positivo Qs PCR e un controllo negativo per piastra). La tabella di preparazione della miscela di reazione di amplificazione PCR presente nell'**Allegato A** indica le quantità necessarie di ogni reagente da miscelare in funzione del numero di campioni da analizzare. Non dimenticare di registrare i 3 punti di controlli.
Nota: non mischiare i lotti di reagenti.

2.2 Dopo la preparazione, la miscela di reazione (Soluzioni di amplificazione e di sonde) va utilizzata immediatamente, o può essere conservata per **2 ore ad una temperatura da +2°C a +8°C**.

2.3 Ripartire **45 µl** di questa miscela di reazione per pozzetto, secondo il piano di piastra definito. Gli **Allegati B e C** propongono piani di piastra da utilizzare rispettivamente sui termociclatori Chromo4™/CFX96™ e MiniOpticon™.

Aggiungere **5 µl** di campione o di controllo negativo o di controllo positivo Qs PCR e chiudere ermeticamente i pozzetti della piastra o delle barrette. È importante insistere sulla chiusura dei pozzetti della piastra o delle barrette per evitare qualunque fenomeno di evaporazione nel corso della reazione PCR.
È importante evitare il formarsi di bolle sul fondo dei pozzetti pipettando con cautela. Per eliminare le bolle, dopo aver sigillato la piastra o aver chiuso le barrette PCR, è possibile centrifugare brevemente la piastra o le barrette PCR. La piastra può essere conservata per **2 ore ad una temperatura da +2°C a +8°C**.

2.4 Posizionare la piastra o le barrette PCR nel termociclatore. Accertarsi che siano orientate correttamente (pozzetti A1 in alto a sinistra).
Chiudere il modulo di reazione.

3. Avvio della reazione di amplificazione
Per avviare la PCR, consultare il manuale d'uso del termociclatore Bio-Rad per il kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

10 - ANALISI DEI DATI
L'analisi dei dati può essere effettuata direttamente al termine della reazione di amplificazione o in seguito riaprendo il file dati. Per aprire dei file dati e analizzare i risultati della PCR, consultare il manuale d'uso del termociclatore Bio-Rad per il kit VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit.

11 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
Per ottenere i risultati dell'analisi, è sufficiente leggere i valori di Ct (Cycle treshold): valore del ciclo di amplificazione a partire dal quale la fluorescenza si innalza significativamente al di sopra del rumore di fondo.

L'analisi manuale consentirà solo un'analisi qualitativa (presenza o assenza).

 © 2010 Bio-Rad

È necessario utilizzare il software Opticon Monitor™ (versione 3.3 o superiore) oppure il CFX Manager™ software Industrial Diagnostic Edition per un'interpretazione automatizzata e quantitativa. Sarà possibile stampare una relazione completa (Cfr. istruzioni del software).

1. Controlli

Prima dell'interpretazione finale dei risultati è necessario verificare i risultati dei controlli negativo e positivo.

Perché il test sia valido, i risultati dei controlli negativo e positivo devono essere i seguenti:

	Rilevazione di Brettanomyces bruxellensis (FAM)	**Rilevazione del controllo interno (Canale HEX)**
Controllo negativo	Ct = N/A*	25 ≤ Ct ≤ 40
Controllo positivo Qs PCR	27 ≤ Ct ≤ 37	Non significativo

** N/A significa "Non Applicabile". Il software indica N/A per il Ct di un campione quando la curva di fluorescenza non interseca la soglia.*

Se i risultati dei controlli positivo Qs PCR e negativo differiscono da quelli descritti nella tabella qui sopra, è necessario ripetere la PCR.

2. Campioni

Un campione è considerato **positivo** per *Brettanomyces bruxellensis* se viene ottenuto un valore di Ct ≥ 10 per il fluoroforo FAM.

Se non viene ottenuto alcun valore per il CtFAM (Ct_{FAM} = N/A), l'interpretazione del risultato dipende dal valore del controllo interno:

- Un campione è considerato **negativo** per *Brettanomyces bruxellensis* se non viene ottenuto alcun valore di Ct per il fluoroforo FAM (Ct_{FAM}=N/A) e se il Ct del controllo interno è superiore o uguale a 28. ($Ct_{HEX} \geq 28$).
- Un valore N/A per il Ct_{HEX} del controllo interno indica, quando il Ct_{FAM} del bersaglio è ugualmente N/A, che probabilmente ha avuto luogo un fenomeno di inibizione della reazione di PCR. In tal caso, il campione di DNA deve essere diluito (a 1:10 per esempio) in acqua distillata sterile, poi sottoposto nuovamente a PCR.
- Se il Ct_{HEX} del controllo interno è inferiore a 28 non è possibile interpretare il risultato. Verificare che la soglia sia stata posta correttamente o che la curva grezza abbia un aspetto caratteristico di amplificazione esponenziale. Se la curva osservata non è corretta, sarà necessario ripetere il test di PCR per questo campione.

Interpretazione dei risultati ottenuti sui campioni:

Rilevazione di Brettanomyces bruxellensis (FAM)	Rilevazione del controllo interno	Interpretazione
Ct ≥ 10***	Non significativo	Positivo
Ct = N/A	Ct_{HEX} ≥ 28	Negativo
Ct = N/A	Ct = N/A	Inibizione**

***: In caso di valore nullo per un campione e il suo controllo interno (Ct = N/A), l'analisi deve essere ripetuta con il campione di DNA diluito (a 1/5° o a 1/10° per esempio).*
****: Può capitare di ottenere un valore inferiore a 10, verificare che la curva come dato grezzo abbia un aspetto caratteristico di amplificazione esponenziale (linea di base piatta, poi aumento regolare della fluorescenza seguito da un plateau). Se la curva osservata è corretta, il campione può essere considerato positivo per la presenza di Brettanomyces bruxellensis. in caso contrario, l'interpretazione del risultato dipende dal valore del controllo interno, come spiegato nei paragrafi precedenti.*

12 - PROTOCOLLO DI CONFERMA A PARTIRE DA COLONIE ISOLATE

È possibile utilizzare il test VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit per la conferma di colonie isolate su agar-agar.

1. Pungere una colonia isolata, a partire da un mezzo selettivo o non, con uno stuzzicadenti o un'ansa da 1 µl, o qualsiasi altro materiale corrente di laboratorio adatto (cono di pipettaggio per esempio).
2. Risospendere la colonia in 100 µl di R2 in una provetta Eppendorf (è possibile risospendere la colonia in soluzione di acqua fisiologica sterile, l'efficienza della PCR può quindi essere influenzato). Omogeneizzare bene la sospensione utilizzando il vortex.
3. Porre 5 µl della sospensione in 45 µl della miscela di reazione PCR (Cf. parte 9.2 PCR in tempo reale) e seguire il resto del metodo VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit per ottenere e interpretare i risultati.
   Nota: una sola analisi qualitativa viene realizzata a partire dalla PCR effettuata su questa sospensione. Il segnale ottenuto in PCR è spesso molto elevato poiché la quantità di cellule prelevate e analizzate mediante PCR con questo metodo è molto considerevole.

13 - PRESTAZIONI DEL TEST E VALIDAZIONI

Il test VINEO™ *Brettanomy*test PCR Kit è specifico per la rilevazione di *Brettanomyces bruxellensis*. È possibile rilevare il lievito a partire da:

- 500 UFC/ml di vino con il protocollo di estrazione del DNA descritto nel VINEO™ Extract DNA Kit: su 1,8 ml per un mosto in fermentazione o un vino carico in corso di vinificazione o di affinamento e
- 10 UFC/ml di vino secondo il protocollo che parte da 45 ml per un vino poco carico, prossimo all'imbottigliamento o già imbottigliato la cui analisi richiede un livello di sensibilità analitica elevato.

 © 2010 Bio-Rad

ALLEGATO A

TABELLA DI PREPARAZIONE DELLA MISCELA DI REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE PCR

Utilizzare questa tabella per determinare le quantità necessarie di sonde fluorescenti e soluzione di amplificazione per preparare la miscela di reazione di PCR. **Il calcolo del numero di campioni deve includere 2 controlli Qs PCR e il controllo negativo**.

Numero di campioni	Sonde fluorescenti (µl) (Tappo rosa)	Soluzione di amplificazione (µl) (Tappo bianco)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1037
25	135	1080
26	140	1123
27	146	1166
28	151	1210
29	157	1253
30	162	1296
31	167	1339
32	173	1382
33	178	1426
34	184	1469
35	189	1512
36	194	1555
37	200	1598
38	205	1642
39	211	1685
40	216	1728
41	221	1771
42	227	1814
43	232	1858
44	238	1901
45	243	1944
46	248	1987
47	254	2030
48	259	2074

Numero di campioni	Sonde fluorescenti (µL) (Tappo rosa)	Soluzione di amplificazione (µl) (Tappo bianco)
49	265	2117
50	270	2160
51	275	2203
52	281	2246
53	286	2290
54	292	2333
55	297	2376
56	302	2419
57	308	2462
58	313	2506
59	319	2549
60	324	2592
61	329	2635
62	335	2678
63	340	2722
64	346	2765
65	351	2808
66	356	2851
67	362	2894
68	367	2938
69	373	2981
70	378	3024
71	383	3067
72	389	3110
73	394	3154
74	400	3197
75	405	3240
76	410	3283
77	416	3326
78	421	3370
79	427	3413
80	432	3456
81	437	3499
82	443	3542
83	448	3586
84	454	3629
85	459	3672
86	464	3715
87	470	3758
88	475	3802
89	481	3845
90	486	3888
91	491	3931
92	497	3974
93	502	4018
94	508	4061
95	513	4104
96	518	4147

© 2010 Bio-Rad

ALLEGATO B
PIANO DI PIASTRA DA UTILIZZARE SUI TERMOCICLATORI Chromo4™ o CFX96™

I primi 3 pozzetti della colonna 1 possono essere utilizzati per analizzare i 3 punti di controlli. Gli altri pozzetti della piastra saranno utilizzati per deporre i campioni da analizzare.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QS											
B	QS											
C	NC											
D	Campione											
E	Campione											
F	…											
G												
H												

NC: Controllo negativo PCR
QS: Controllo positivo Qs PCR

ALLEGATO C
PIANO DI PIASTRA DA UTILIZZARE SUL TERMOCICLATORE MiniOpticon™

I primi 3 pozzetti della colonna 1 possono essere utilizzati per analizzare i 3 punti di controlli. Gli altri pozzetti della piastra saranno utilizzati per deporre i campioni da analizzare.

	1	2	3	4	5	6
A	QS					
B	QS					
C	NC					
D	Campione					
E	Campione					
F	…					
G						
H						

NC: Controllo negativo PCR
QS: Controllo positivo Qs PCR

 © 2010 Bio-Rad

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

L'utilizzazione di questo prodotto è tutelata da uno o molti dei seguenti brevetti statunitensi e dalle rivendicazioni di brevetto corrispondenti fuori degli Stati Uniti: 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (unicamente rivendicazioni da 1 a 23) e 5 773 258 (unicamente rivendicazioni da 1 a 6) e dalle rivendicazioni fuori degli Stati Uniti corrispondenti al brevetto USA n. 4 889 818. L'acquisto di questo prodotto comprende un'immunità da azioni giudiziarie limitata e non trasferibile conformemente alle rivendicazioni di brevetti precedenti quando questa quantità di prodotto viene utilizzata unicamente a scopi di analisi alimentare, di analisi ambientale e in microbiologia industriale, compresa la pubblicazione dei risultati delle attività dell'acquirente mediante pagamento o qualsiasi altra contropartita commerciale, e quando viene egualmente utilizzata per le ricerche proprie dell'acquirente. Non viene espressamente ceduto alcun diritto sulla base di una qualunque rivendicazione di brevetto (quali le rivendicazioni del metodo 5'-nucleasi nei brevetti USA n. 5 210 015 e 5 487 972) che sia per implicazione o per preclusione. Informazioni più complete riguardanti l'acquisto di licenze possono essere ottenute contattando il Direttore delle licenze, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, Stati Uniti.

Purchaser's information: VINEO is a trademark of Bio-Rad
Information à l'acheteur : VINEO is a trademark of Bio-Rad
Información al comprador: VINEO es una marca registrada de Bio-Rad
Informazione per l'acquirente: VINEO è un marchio registrato di Bio-Rad

Bio-Rad
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33

Rev. D - 12/2010